

PENETAPAN STANDAR NASIONAL VAKSIN DIFTERI, PERTUSSIS, TETANUS

Penetapan Standar Nasional Toksoid Serap Difteri.

Oleh : Muljati Prijanto, Sumarno, Pudjo Prajitno *

ABSTRACT

To check the potency of DPT vaccine, standard preparations of the components, namely Adsorbed Diphtheria Toxoid, Pertussis Vaccine and Adsorbed Tetanus Toxoid, are needed.

Since WHO International Standard Preparations are distributed only in limited amounts, WHO has suggested that each member country should develop a National Standard, which is matched against International Standard Preparation.

An Indonesian National Standard of DPT vaccine (lot 1) has been prepared and lyophilized at the National Institute of Health in Tokyo.

The potency of the National Standard of Adsorbed Diphtheria Toxoid is determined by antibody titration in guinea pigs. Antitoxin titres are determined by cell culture method.

After several experiments, the potency of the National Standard of Adsorbed Diphtheria Toxoid has been decided of being 59 IU/ml.

Using the same standard preparations, namely the National Standards, it is hoped that from the same lot of DPT vaccine, similar results of potency could be achieved when determined by the Government Vaccine Quality Control laboratory and the Manufacturer's laboratory.

PENDAHULUAN

Untuk memeriksa potensi vaksin DPT diperlukan standar masing-masing komponennya yaitu: toksoid serap difteri, vaksin pertussis dan toksoid serap tetanus. Mengingat Standar Internasional yang dibuat oleh WHO sangat terbatas jumlahnya, maka setiap negara yang telah memiliki kemampuan dianjurkan oleh WHO agar membuat Standar Nasional dengan cara membandingkannya terhadap Standar Internasional. Standar Nasional vaksin DPT yang pertama ini dibuat dalam bentuk kering di Jepang.

Untuk menetapkan potensi toksoid serap difteri digunakan cara titrasi zat anti pada marmut. Titer zat anti diperiksa dengan menggunakan biakan sel ("cell culture").

Dengan digunakannya satu macam standar, diharapkan hasil potensi yang didapat tidak ber-

beda jika suatu lot yang sama diperiksa oleh laboratorium yang berlainan misalkan oleh laboratorium pengontrol kualitas milik pemerintah atau laboratorium produsen vaksin.

BAHAN DAN CARA KERJA

Standar Internasional Toksoid Serap Difteri dalam bentuk kering ("lyophilized") diperoleh dari Statens Serum Institute di Copenhagen, dan mengandung 42 mg toksoid per ampul (0,318182 mg = 1 IU). Calon standar toksoid serap difteri diperoleh dari NIH, Tokyo pada tahun 1979.

Marmut (guinea pig) strain Hartley diperoleh dari NIH di Tokyo, yang kemudian dibiakkan oleh Bidang Hewan Percobaan pada Pusat Penelitian Biomedis di Jakarta.

Cara Pembuatan Standar

Toksoid serap difteri yang telah diketahui potensinya ditambah dengan serum marmut de-

* Pusat Penelitian Biomedis, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta.

ngan perbandingan volume yang sama. Serum yang digunakan sebagai stabilisator harus tidak mengandung zat anti terhadap difteri. Serum dipilih setelah dilakukan test dengan cara pasif haemagglutinas. Satu ml campuran tersebut dikeringkan dalam tiap-tiap ampul.

Pemeriksaan potensi: enam puluh ekor marmut, bobot badan antara 250–350 gram dibagi dalam 6 kelompok yang masing-masing terdiri dari 10 ekor. Marmut tersebut diimunisasi secara subkutan dengan 3 seri pengenceran Standar Internasional dan calon standar, dengan volume masing-masing 2,0 ml. Pengenceran standar mengandung berturut-turut 6,3 IU/ml, 2 IU/ml, 0,63 IU/ml. Calon standar harus dilarutkan lebih dahulu dengan 1 ml larutan garam faali, kemudian, diencerkan berturut-turut 31,6 kali, 100 kali dan 316 kali. Enam minggu setelah imunisasi, marmut diambil darahnya, kemudian sera dipisahkan. Sera dititrasi menggunakan cara biakan sel.

Pemeriksaan titer antitoksin dengan cara mikro kultur sel:

Biakan sel diperoleh dari Bidang Virologi pada Pusat Penelitian Biomedis. Sel Vero dipasase dalam medium Eagle's minimum essential (MEM) yang mengandung 10 % calf serum.

Toksin difteri digunakan sebagai antigen, diperoleh dari NIH, Tokyo, berupa toksin yang telah dimurnikan dan mengandung 3300 lf/mg N. Standar antitoksin difteri diperoleh dari NIH di Tokyo dan mengandung 10 IU/ml. Pada pemeriksaan ini digunakan "microplate" dengan dasar berbentuk U, serta "transferplate" buatan Cooke Engineering Co.

Pengenceran sera dalam "transferplate" dilakukan sebagai berikut:

Semua lubang (well) "transferplate" diisi dengan larutan medium MEM sebanyak 0,025 ml. Lubang pertama diisi dengan 0,025 ml sera yang akan diperiksa. Sera diencerkan dengan kelipatan 2 kali sampai lubang yang terakhir. Setelah itu ditambahkan toksin difteri sebanyak 0,025 ml (4 MCD) ke dalam setiap lubang. Kemudian dicampur menggunakan "micromixer" selama 3 menit dan dimasukkan ke dalam inkubator selama 1 jam pada suhu 37°C untuk berlangsungnya proses netralisasi. Dalam "microplate" setiap lubang diisi medium MEM sebanyak 0,10 ml. Kemudian apa yang ada di dalam "transferplate" dipindahkan ke dalamnya dengan cara meletakkannya di atas "microplate" tersebut. Setelah itu ke dalam semua lubang ditambahkan sel Vero sebanyak 0,05 ml ($2 \cdot 10^5$ sel/ml).

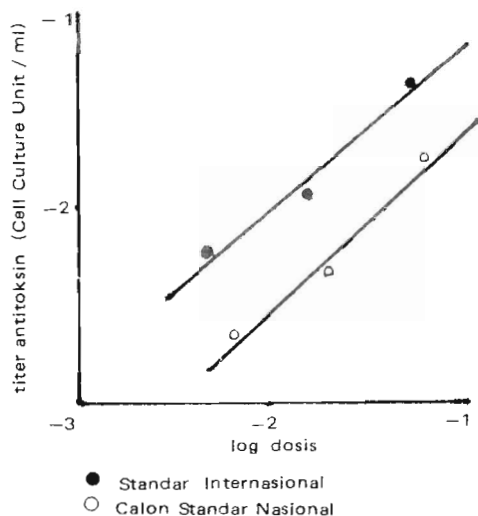
"Microplate" kemudian ditutup dengan parafilm dan dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 5–6 hari. Untuk kontrol toksin, antitoksin dan sel digunakan cara yang sama seperti di atas, hanya untuk sel pengenceran dilakukan dalam tabung. Pembacaan hasil dilakukan dengan melihat perubahan warna dari merah menjadi kuning setelah 5–6 hari, yang menunjukkan adanya reaksi antara antigen dan zat anti.

Analisa hasil dilakukan dengan cara "parallel line assay" (1) untuk menjelaskan kesejajaran garis reaksi kekebalan pada hewan percobaan serta untuk menghitung potensi vaksin.

HASIL

Hasil dari 4 kali pemeriksaan potensi dapat dilihat pada tabel 1, dengan potensi rata-rata yaitu 59,35 IU/ml dan harga batas antara 51,45

Gambar 1. Uji kesejajaran garis reaksi kekebalan marmut terhadap toksoid serap difteri



PENETAPAN STANDAR NASIONAL VAKSIN DIFTERI, PERTUSSIS, TETANUS

– 68,45 IU/ml (pada $P = 0,95$).

Keempat pemeriksaan tersebut di atas menunjukkan adanya hubungan linier antara dosis yang diberikan dengan titer antitoksin yang terbentuk setelah 6 minggu, serta adanya kesejajaran

garis antara Standar Internasional dengan toksoid serap difteri yang diperiksa. Salah satu hasil tersebut ditunjukkan pada gambar I.

Isi setiap ampul Standar Internasional maupun Standar Nasional ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan potensi toksoid serap difteri pada marmut

Percobaan	Jumlah hewan std : calon std	Potensi relatif * IU/ml	\bar{b}	s^2
I	30 : 30	34,4 (17,9 – 65,9)	0,8710	0,1690
II	30 : 30	65,0 (51,0 – 83,1)	1,0385	0,0403
III	30 : 30	56,0 (44,0 – 71,0)	1,1311	0,0461
IV	30 : 30	69,0 (48,5 – 98,2)	1,3047	0,1398
Rata-rata =		59,35	(51,45 – 68,45)	1 IU/ml

* Terhadap Standar Internasional Toksoid Serap Difteri, 132 IU/ml
(. . . .) batas signifikansi, $p = 0,95$

Tabel 2. Kandungan bahan dalam standar toksoid serap difteri

Kandungan bahan	Standard Internasional Toks. Ser. Dif. *	Standar Nasional Toks. Ser. Dif.
Toksoid/ampul	42,00 mg 132,00 IU 100,00 Lf	36,80 mg 59,35 IU 60,00 Lf
1 mg toksoid	3,14 IU 2,38 Lf	1,61 IU 1,63 Lf
1 IU toksoid	0,32 mg 0,76 Lf	0,62 mg 1,01 Lf
1 Lf toksoid	0,42 mg 1,32 IU	0,61 mg 0,99 IU
Al/ampul	1,00 mg	0,50 mg
Stabilisator	Haemaccel 26,00 mg/ampul	Haemaccel ** 50 %

* Standar kedua

** Hoechst, no. batch.: 285023/4.

PEMBAHASAN DAN KESIMPULAN

Dari analisa hasil, baik potensi maupun kesejajaran garis yang menunjukkan reaksi kekebalan pada hewan, maka toksoid serap difteri yang diperiksa telah memenuhi persyaratan untuk digunakan sebagai Standar Nasional.

Dari hasil pemeriksaan yang telah dilakukan, maka ditetapkan bahwa potensi Standar Nasional toksoid serap difteri (lot 1) adalah 59 IU/ml.

Penentuan potensi vaksin untuk Indonesia sangat penting mengingat penyakit difteri masih terdapat hampir di seluruh Indonesia meskipun dalam prevalensi yang berbeda-beda. Selain itu pemakaian vaksin di Indonesia secara kuantitatif cukup besar bila dihubungkan dengan jum-

lah penduduknya yang mencapai kira-kira 147 juta jiwa, lebih-lebih dengan dilaksanakannya pengembangan program imunisasi di Indonesia.

Standar Nasional ini selanjutnya dipakai untuk memeriksa potensi vaksin DPT yang akan digunakan di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Japan International Cooperation Agency (JICA) yang telah memberikan bantuan dalam hal pembuatan standar serta alat-alat dan bahan-bahan yang sukar diperoleh di Indonesia. Juga kepada Dr.S.Kameyama, expert di bidang difteri dan tetanus toksoid yang telah membantu standarisasi ini kami sangat berterima kasih.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Finney, D.J. Statistical methods in biological assay. Charles Griffin & Co., Ltd., London, 1952, 99 – 138.
2. Mandic, L.H. Establishing of the National Reference Preparation for diphtheria toxoid (DPT plain, DPT adsorbed) and its application in the testing of preparation containing diphtheria toxoid. Institute of Immunology, Zagreb, 1965.
3. K. Miyamura, E. Tajiri, A. Ito, R. Murata, R. Kono. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using Vero Cell. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. Jour Biol Stand, 1974, 2, 189 – 201.
4. WHO Expert committee on Biological Standardization. Requirement for Diphtheria Toxoid and Tetanus Toxoid. Wld Hlth Org. Techn Rep Ser, 1970, 293.